

200807019A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

ヒトパピローマウイルス持続感染制御に関する

ゲノム医学からのアプローチ

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者：吉浦孝一郎

長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・教授

平成21年（2009年）4月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

ヒトパピローマウイルス持続感染制御に関する
ゲノム医学からのアプローチ

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者：吉浦孝一郎
長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・教授

平成21年（2009年）4月

目 次

I. 総括研究報告書

- ヒトパピローマウイルス持続感染制御に関する
ゲノム医学からのアプローチ
吉浦孝一郎（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授）……………1

II. 分担研究報告書

1. 患者試料収集態勢の整備, 情報の整理統括 ……………19
研究分担者
増崎英明（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授）
中山大介（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授）
三浦清徳（長崎大学医学部・歯学部附属病院・講師）
研究協力者
山崎健太郎（長崎大学医学部・歯学部附属病院・助教）
2. 患者試料の遺伝子型タイピング ……………32
研究分担者
吉浦孝一郎（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授）
木下 晃（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・助教）
木住野達也（長崎大学先導生命科学研究支援センター・
遺伝子実験施設・准教授）
近藤 新二（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ……………40

IV. 研究成果の刊行物・別冊 ……………44

総 括 研 究 報 告

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
平成20年度総括研究報告書

ヒトパピローマウイルス持続感染制御に関するゲノム医学からのアプローチ

主任研究者：吉浦孝一郎（長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・教授）

研究要旨

本研究は、ヒト子宮頸癌の原因であるヒトパピローマウイルス（HPV）の持続感染に関わる、宿主（ヒト）側の遺伝的要因を明らかにすることを第一の目的としている。また、目的達成のための試料収集時には、ヒト子宮頸癌および子宮頸部異形成の例で認められる HPV の型を明らかにし、それらをフォローアップすることによって、日本人における高リスク HPV の頻度を明らかにすることを第二の目的としている。

分担研究者

木住野 達也（長崎大学先端生命科学研究支援センター・遺伝子実験施設・准教授）
近藤 新二（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・薬物治療学・准教授）
木下 晃（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・人類遺伝学・助教）
増崎 英明（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科産科婦人科学・教授）
中山 大介（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科産科婦人科学・准教授）
三浦 清徳（長崎大学医学部・歯学部附属病院産科婦人科学・講師）

A. 研究目的

本研究の目標は、子宮頸癌の発症リスクを高めているヒトの single nucleotide polymorphism (SNP) の検索を行い、SNP タイピングによって子宮頸癌検診の効率を高めること、またワクチン投与に関し科学的な基盤情報を得ることを目的とする。これは先進国のなかで子宮がん検診の受診率が低く、若年者の進行した子宮頸癌が増加している日本国の厚生医療に有益な情報をもたらす、本国の少子化対策の一環と位置づけられる。

子宮頸癌の発症は、ほとんど (>95%) がヒトパピローマウイルス (HPV) の持続感染 (HPV を体内から排除できない) によると考えられている。HPV 感染は、ほとんど全ての女性が経験すると考えられているが、90%以上（あるいは、ほとんどすべて）が自然治癒すると考えられているのである。すなわち、子宮頸癌は HPV 感染を自然治癒できない集団からの発症するのであり、なぜ HPV 感染が持続感染する集団と HPV 感染が自然治癒する集団とに分かれるのかは明らかではない。このような事実の上で、HPV 感染が持続感染す

る集団をあらかじめ予測できる手段を明らかにできれば、子宮頸癌発症が予測可能となる。

今回の研究の最大目標は、HPV 感染が持続感染する集団と HPV 感染が自然治癒する集団を区別できる SNP を検索することである。しかも、HPV 感染と子宮頸癌発症の関連研究によるオッズ比は 100 を超えるものであり、目標とする“予測 SNP”は予測精度（感受性）が高く、予測特異度が高いものである可能性がある。いわゆる common disease（ありふれた病気）の関連研究からえられる関連 SNP とは異なり、ほとんど HPV 持続感染を決定する単一遺伝子変化に近いものであると予想される。

ヒトの SNP の検索のためには、きちんと情報がリンク管理された試料の収集が絶対条件であり、研究初年度から 2 年目である本年度にかけて、産婦人科学教室との連携による試料収集システムの構築、HPV 感染患者試料収集、HPV 型判定を行いつつ試料収集を行い、長崎県における HPV 感染の疫学的な調査もかねて研究を進めた。

1. 日本人にみられるヒトパピローマウイルス (HPV) 型の頻度算出

子宮頸癌検診によって要精密検査とされた患者群から子宮頸部擦過細胞と頸管粘液を採取し、細胞診と HPV 型判定を同時に行う。細胞診の結果と HPV 型を対比させ、異型度の進んだ患者群に認められる HPV 型頻度を算出し、「異型度が進んだ組織にみとめられる」という意味での高リスク HPV の頻度を算出する。本年度

は、“本来の一般集団” HPV 感染の型別頻度算出を行う目的で、妊婦を一般成人女性集団として子宮頸部細胞診、HPV 感染の有無と HVP 型判定を行った。本スクリーニングによる一般的 HPV の頻度の算出は、これまでに報告された「子宮頸癌に多くみられる」という意味での高リスク HPV が日本人においてどれくらい認められるかを確定させることができる。一般の日本人に認められる HPV 型頻度は、ワクチン作製の基礎データとなりうる。つまり、ワクチンの対象 HPV 型として何を目標にすべきかの科学的根拠を与える。

HPV の型判定は、現在の日本の子宮頸癌検診システムの検討を考慮する必要があるので、塗抹法およびシムレイヤー法による細胞診を日母分類およびベセスダシステムを用いて判定し、HPV 型判定はアンプリコア®リニアアレイ HPV ジェノタイプングキット (Roche ダイアグノスティック社) による HPV タイピングを採用することとした。細胞診でクラス IIIa 以上と判定された症例にはコルボスコピー検査を行い組織診が行われた。

2. 子宮頸癌の発症リスクを高めている宿主であるヒトの SNP の検索

HPV の分類は子宮頸癌試料から分離される頻度が高いか低いかによって、高リスク群と低リスク群に分類されるが、実際の子宮頸癌試料からは高リスク群も低リスク群も分離される。病因である HPV 側だけから子宮頸癌発症を考察することでは、病因のみの側面しか解明できない。今回は、持続感染者 (HPV を体内から排除できない) に注目し、持続感染に至る宿

主側の因子が存在するのではないかと考え、患者対照試験により一塩基置換多型 (SNP) を用いた全ゲノムスキャン (GWAS) によってその規定因子を探索することを目標とした。

当初は、収集された持続感染群 (患者) と HPV 排除群 (対照) の DNA を用いて、全ゲノム SNP タイピング後の患者対照試験 (GWAS: Genome Wide Association Study) を行う方針であった。1) 本サンプリング法は、エクストリームサンプリング (extreme sampling) 法であること 2) 遺伝的背景が均一な集団が収集できることにより、GWAS 法としては比較的少数 (たとえば、100 患者 vs 多くの対照) による解析で到達できると期待される。しかも、子宮頸癌に HPV の持続感染が関与していることは、ほぼ 100% であるから、宿主要因が存在すれば、確実に同定することが出来る。本報告書作成時には、試料収集を開始して、1 年 4 ヶ月時の試料収集時点のものである。これまでの試料収集進行具合を考慮し、HPV 排除群を対照集団として解析するには、多くの対象集団の設定と長期間の継続観察が必要であることが明確となっており、本年度内の GWAS の対照群として“HPV 消失群”を用いることは不可能であると判断、対照群として一般集団女性あるいは、感染していない妊婦群を使用することとした。本変更は、一般集団と考えられる妊婦でも 25% が HPV 感染しており、子宮頸癌の発症率から考えると一般集団を HPV 感染排除群としても検定力の低下は僅かだろうと考えられる。

本研究は、GWAS による HPV による子宮頸癌発症リスク SNP の決定および解析対象集団の継続的 HPV 感染状態の観察により、HPV 感染の治癒過程と HPV 型との関連の明確化、日本人における高リスク HPV 型の一般感染頻度が得られワクチンとしてターゲットにする HPV 型の情報取得、持続感染群を規定する SNP の同定によるワクチン投与対象群の明確化など今後の日本の厚生行政に生かす貴重なデータを提供できる。

B. 研究方法

1. 試料収集

最終目標達成に向け最も力を注ぐべき点であり、長崎大学医学部産婦人科学教室および関連病院の協力無くしては、本研究は成り立たない。細胞診、組織診の病理診断と関連づけながら収集するシステムティックな試料収集・管理システムを構築し、血液試料の収集のみならず、現在の子宮頸癌検診システムと HPV のタイピング情報も加味したベセスダシステムとの検討も兼ねるように考慮した。

試料は、検診時に採取する子宮頸部擦過細胞、頸管粘液および血液試料である。子宮頸部擦過細胞と頸管粘液は、通常の診療業務で行う細胞診と HPV ジェノタイプングキット用に分けて採取し、血液は通常の全血からの DNA 抽出を行っている。また、血液の一部からは血清採取を行い保存した。DNA 抽出は、溶血後に白血球を集め、SDS-proteinase K による溶解後にフェノール・クロロホルム抽出後、TE に対する透析法により行った。

なお、本研究の試料収集は、長崎大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会、およびそれぞれの協力病院の倫理委員会の承認を得て開始されており、全ての試料について書面にてインフォームドコンセントを得ている。遺伝子解析の倫理上の問題が生じないように手続きを行い、研究を遂行した。

2. 日本人にみられるヒトパピローマウイルス (HPV) の頻度算出

HPV 型判定は、アンプリコア®リニアアレイ HPV ジェノタイピングキット (Roche ダイアグノスティック社) を採用し、細胞診による異型度と HPV の型頻度との対応、あるいは組織診と HPV の型頻度との対応を行った。

3. Affymetrix 社製 GeneChip システムによるジェノタイピング

文部科学省 21 世紀 COE プログラムによって購入された Affymetrix 社の GeneChip システムを使用して全ゲノム SNP タイピングを行った。Genome-Wide Human SNP 5.0 Array または 6.0 アレイを購入してタイピングした。本年の申請書の評価により、Genome-Wide Human SNP 6.0 Array による SNP タイピングを推奨され、子宮頸癌試料 (case) は、Genome-Wide Human SNP 6.0 Array によって行った。対照には、一部に Genome-Wide Human SNP 5.0 によるタイピングも行っている。対照群の Genome-Wide Human SNP 6.0 Array による SNP タイピングは今後の課題である。

全ゲノム SNP ジェノタイピングは、Affymetrix 社製 GeneChip システムを用いて行った。指定された手順に従い、48 試料を扱うプロトコールで行った。システムのスキャナーによりシグナル取得後に Genotyping Console によって、タイピングを行った。

解析対象数は、76 例の子宮頸癌患者と一般集団対照集団として合計 196 例を対照群として解析した。

C. 研究結果

1. 試料収集システムの構築、HPV 感染患者試料収集

長崎大学医学部産科婦人科教室関連病院の協力を仰いで、子宮頸部擦過細胞、頸管粘液および血液試料の収集・管理システムを整えた。長崎大学医学部・歯学部附属病院、長崎市民病院、日本赤十字社長崎原爆病院、佐世保市立総合病院の 4 箇所で試料収集を行うこととした。収集対象者は、主に子宮がん検診で子宮頸部細胞診異常 (クラス IIIa 以上) を指摘された例を対象とした。それらに精密検査としてコルポスコピー検査を施行し、子宮頸部異形成を指摘された群、妊婦群、そして持続感染者と見なせる子宮頸癌発症者 (手術後の患者も含む) の 3 群に分類した。子宮頸部異形成と診断された群は、フォローアップすることによって HPV 感染の消失を確認できる群である。妊婦は、いわゆる長崎の一般女性集団における HPV の頻度算定が可能であるので、子宮頸部異形成を指摘された群に認められる HPV の型と比較するための基本データとして非常に重要である。実際の HPV 型

判定は、シンレイヤ法による細胞診も含めてエスアールエル（SRL）と共同で行っている。システム構築に数ヶ月を要し、平成19年8月から実際の試料収集作業が始まった。平成20年10月23日までに延べ698例の症例を収集しており、一ヶ月平均50例弱から試料収集を行っている。臨床病名による内訳は、妊娠中採取例が15%、異形成が66%、上皮内癌が7%、子宮頸癌（浸潤癌）が7%、その他が5%であった。細胞診結果による内訳は、クラスI:9%、クラスII:38%、クラスIII:7%、クラスIIIa:27%、クラスIIIb:11%、クラスIV:3%、クラスV:5%であった。

2. 日本人にみられるヒトパピローマウイルス（HPV）の頻度算出

扁平上皮癌15例におけるHPV型は、16型:2例、18型:3例、45型:1例、52型:5例、58型:2例、59型:2例、感染なし:1例であった（延べ数が16例となっているのは、58型と59型の混合感染が1名いるため）。腺癌2例は、1例が上皮内の腺由来でHPV:18型、1例が子宮内膜由来でHPV:陰性であった。

妊婦22例におけるHPV感染頻度は、非感染者が14例で感染者が8例であった。6型:1名、18型:2名、52型:3名、他に1名:16+33混合感染、1名:33+56+CP6108混合感染であった。

3ヶ月後に再検査できた17例について、感染HPV型が変化したかどうかを検討してみると4例においてHPV感染の完全消失や混合感染していたHPV型のうち一部の型の消失が認められた。

平成20年12月20日までに収集した全症例において感染を確認したHPV型の頻度は、最も多いのが16型、次に52型、次に18型と58型が同数となっている。

3. 子宮がん検診におけるベセスダシステムの有用性-日母分類との比較から-

子宮頸癌検診について日母分類に基づいた子宮頸部細胞診と比較して、ベセスダ分類に基づいた子宮頸部細胞診とHPV-DNA型検査を採用した場合の有用性について検討した。パイロットスタディーとして2007年8月から2008年3月までに、HPV-DNA型検査の同意を得て妊娠初期に子宮頸癌検診を受けた30例の妊婦を対象とした。全例にHPV-DNA型検査、日母分類およびベセスダシステムに基づいた細胞診を施行した。30例のうち24例は妊娠末期に再検査を施行した。検査結果を表1に示す。症例1は妊娠初期の日母分類に基づいた細胞診判定でクラスIV、ベセスダ分類でSCC+AGCと判定され、HPV16型陽性であった。妊娠初期の日母分類でクラスIIIb（症例2、症例3、症例4）もしくはクラスIII（症例5）と判定された4例はベセスダ分類でいずれもHSILと判定され、ハイリスク型HPV陽性であった。症例2、症例3および症例5の3例は妊娠末期に子宮頸部細胞診とHPV-DNA型検査を再検された。症例2における妊娠末期の細胞診判定は日母分類でクラスIIIa、ベセスダ分類でLSILに変化し、HPV-DNA型は妊娠初期に認めたHPV58型は消失し、HPV52型およびHPV66型の混合

感染を認めた。一方、症例3および症例5の細胞診所見に変化はなく、それぞれHPV16型とHPV33型の混合感染、HPV31型とHPV61型の混合感染の持続感染が認められた。妊娠初期の日母分類でクラスIIIaと判定された3例はベセスダ分類でASC-US(症例6, 症例7)もしくはLSIL(症例8)と判定され、いずれもハイリスク型HPV陰性であった。3例のうち症例6と症例8は妊娠末期に子宮頸部細胞診とHPV-DNA型判定を再検され、細胞診判定はいずれも日母分類でクラスII, ベセスダ分類で陰性と判定された。また、HPV-DNA型検査の結果は、いずれもハイリスク型HPV陰性であった。妊娠初期の日母分類でクラスIIと判定された16例のうち15例(症例10-症例24)はベセスダ分類で陰性と判定され、1例(症例9)はASC-USと判定された。HPV-DNA型検査の結果、3例(症例9, 症例10および症例11)にHPV52型、2例(症例12および症例14)にHPV18型、1例(症例13)にHPV33型とHPV56型の混合感染を検出された。6例のうち5例(症例9-症例13)は妊娠末期に子宮頸部細胞診とHPV-DNA型検査を再検され、ハイリスク型HPVの持続感染を認めた。HPV52型陽性であった症例9, 症例10および症例11の細胞診判定の結果はいずれも正常であった。一方、HPV18型陽性の症例12およびHPV13型とHPV56型の混合感染を認めた症例13の細胞診所見は日母分類でいずれもクラスIIIa, ベセスダ分類でそれぞれLSIL, ASC-USと判定された。症例15は妊娠初期の細胞診判定は正常、妊娠末期のそれは日母分類でクラスIIIa, ベセスダ分類でASC-USに変化していたが、

妊娠期間を通じてHPV感染は認められなかった。妊娠初期の日母分類でクラスIと判定された6例(症例25-症例30)はいずれもベセスダ分類で陰性と判定された。HPV-DNA型判定の結果、症例25にHPV6型、症例29にCP6108を検出された。妊娠末期に細胞診とHPV-DNA型判定を再検された4例(症例25-症例28)の結果に変化は認められなかった。

以上より、日母分類に基づいて子宮頸部細胞診をクラスIIIaと判定した症例は、ベセスダ分類でもASC-USもしくはLSILと判定しており、子宮頸癌検診の細胞診判定を日母分類からベセスダ分類へ変更して検査しても判定結果に差はないと考えられた。

また、妊娠初期にベセスダ分類で細胞診異常を認めてもハイリスク型HPV陰性のものは妊娠期間内に細胞診の結果は正常化する傾向にあり、症例15の妊娠末期に認めた細胞診異常もハイリスク型HPV陰性なので、一過性の異常所見かもしれない。

ハイリスク型HPVのなかでもHPV52型陽性を認めるものの細胞診判定の結果は妊娠期間内に正常のまま変化しないか、あるいはHSILからLSIL, ASC-USもしくはLSILから陰性へと変化していた。一方、HPV16型, HPV18型あるいはHPV52型感染を含まない混合感染を認めるものは妊娠期間を通じて細胞診異常に変化を認めないか、あるいは細胞診判定が正常から異常へと変化を認めていた。よって、ハイリスク型HPV感染の有無とそのHPV-DNA型により妊娠期間内の細胞診所見に及ぼす影響が異なる傾向にあるため、日母分

類による子宮頸癌検診と比較してベセスダ分類に HPV-DNA 型検査を組み合わせた検診法は細胞診判定の推移を推定するこ

とに有用と考えられ、子宮頸癌検診の間隔は HPV-DNA 型による個別化の必要性が考えられた。

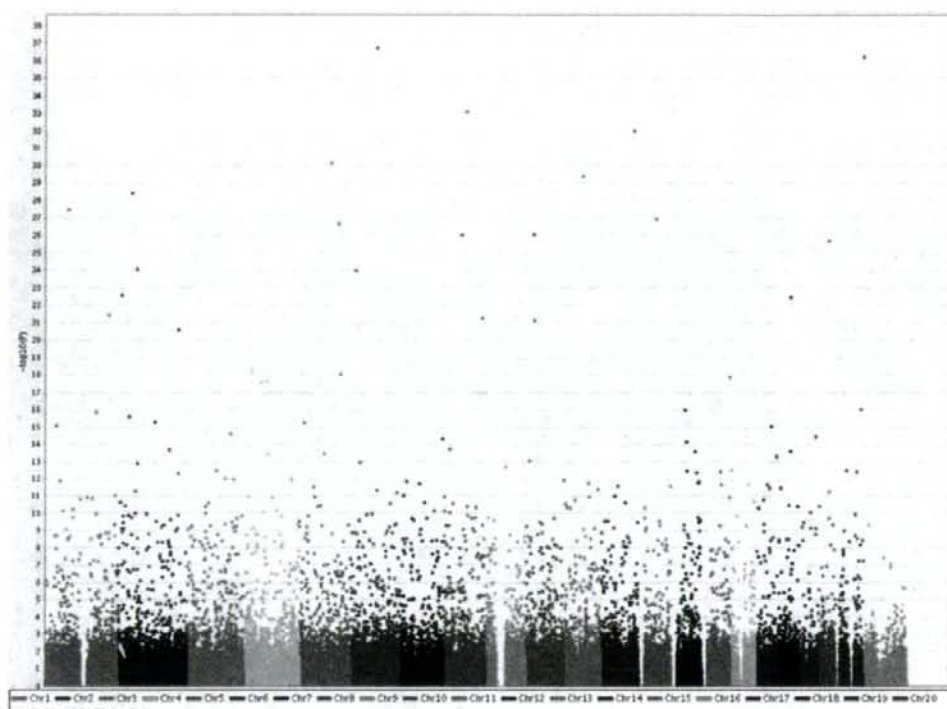
表1. 妊婦30例における子宮がん検診とHPV-DNA検査

症例	妊婦初期			妊婦末期		
	HPV genotype	細胞診(日荷)	細胞診(ベセスダ)	HPV genotype	細胞診(日荷)	細胞診(ベセスダ)
1	18	IV	SCC-AGC			
2	58	Ⅲb	HSL	52 66	Ⅲa	LSSL
3	16 33	Ⅲb	HSL	16 33	Ⅲb	HSL
4	16 31 52	Ⅲb	HSL			
5	31 61	Ⅲ	HSL	31 61	Ⅲ	AGC
6	陰性	Ⅲa	ASC-US	陰性	Ⅲ	陰性
7	陰性	Ⅲa	ASC-US			
8	陰性	Ⅲa	LSSL	陰性	Ⅲ	陰性
9	52	Ⅲ	ASC-US	52	Ⅲ	陰性
10	52	Ⅲ	陰性	52	Ⅲ	陰性
11	52	Ⅲ	陰性	52	Ⅲ	陰性
12	18	Ⅲ	陰性	18	Ⅲa	LSSL
13	33 56 CP6106	Ⅲ	陰性	33 56	Ⅲa	ASC-US
14	18	Ⅲ	陰性			
15	陰性	Ⅲ	陰性	陰性	Ⅲa	ASC-US
16	陰性	Ⅲ	陰性	42	Ⅲ	陰性
17	陰性	Ⅲ	陰性	陰性	Ⅲ	陰性
18	陰性	Ⅲ	陰性	陰性	Ⅲ	陰性
19	陰性	Ⅲ	陰性	陰性	I	陰性
20	陰性	Ⅲ	陰性	陰性	Ⅲ	陰性
21	陰性	Ⅲ	陰性	陰性	Ⅲ	陰性
22	陰性	Ⅲ	陰性	陰性	Ⅲ	陰性
23	陰性	Ⅲ	陰性	陰性	I	陰性
24	陰性	Ⅲ	陰性	陰性	I	陰性
25	6	I	陰性	6	Ⅲ	陰性
26	陰性	I	陰性	陰性	Ⅲ	陰性
27	陰性	I	陰性	陰性	I	陰性
28	陰性	I	陰性	陰性	Ⅲ	陰性
29	CP6106	I	陰性			
30	陰性	I	陰性			

3. 全ゲノム SNP ジェノタイピングと関連解析 (GWAS)

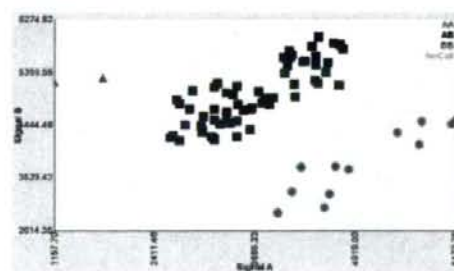
収集した試料から組織診断によって子宮頸癌と診断された76例をGWASの患者としてジェノタイピングを行った。このうち、最終的に組織診断により子宮頸癌と確定した64名を患者として取り扱った。一般集団対照集団として初年度 Genome-Wide Human SNP 5.0 Array により、既にジェノタイピングを行っていたものも今回の統計解析に加えた。合計196例を対照群として解析した。本来なら、す

べての患者・対象を Genome-Wide Human SNP 6.0 Array により解析して約90万個の SNP により解析すべきであるが、本年度の予算の枠内での推進が困難であったので、昨年度の結果も利用するかたちとなった。タイピング結果は、plink により関連解析を行い、plink による解析結果は haploview により図式化した(図1)。



plink 解析の対象 SNP 選択の設定は、対照集団においてマイナーアレル頻度 (MAF: minor allele frequency) > 0.01 , Hardy-Weinberg 平衡検定 p-値 (HWE) > 0.0004 , SNP call rate > 0.9 に設定した。極端に低い p-value をしめす SNP は、もとのジェノタイピングがうまく行われていないことが知られており、ジェノタイピング時のクラスタリング解析の図を参考に (図 2), きれいなクラスタリングが行われておりかつ p-value の低い rs11831414 (p 値 $< 10^{-32}$) と rs7747216 (p 値 $< 10^{-18}$) とを実際にシーケンスでジェノタイピングの正確性を確認した。

rs11831414



rs7747216

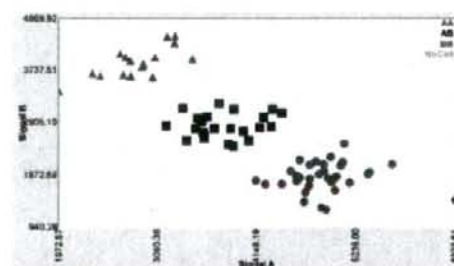


図 2

シーケンスによる確認の結果、rs11831414とrs7747216のジェノタイピングは、クラスター上はうまく分離されている様に見えたが、実際のジェノタイプを反映しておらず、結果は患者と対照で差がなかった。子宮頸癌群、対照群ともに数的に十分でないが、研究終了までに充分数の試料を収集して関連解析の終了を目指す。Genome-Wide Human SNP 6.0 Arrayによるジェノタイピング、plinkによる統計解析等の以下の作業は、問題なく進行できる。

D. 考察

本研究課題の目標である「ヒトパピロームウイルス持続感染制御にかかわるSNPもしくはCNV探索」においては、試料収集が律速段階である。

子宮頸癌患者と一般女性の比較であれば、試料収集に時間を費やしHPVの型判定も必要ないと考えられるが、HPVの型判定・細胞診との関連・組織診との関連・高度異形成とHPV型との日本での関連など、日本で収集すべきHPV関連研究データを全て解析可能な研究デザインとして進行させている。

HPV感染消失群は一般女性がほとんどこの部類に入ると思われるので、収集に関しては異形成フォローアップ者の中での消失群を捉えるのではなくとも、一般女性で代用できると考えられこちらの群の収集は順調である。

現在Genome-Wide Human SNP 6.0 Arrayにより解析終了した子宮頸癌試料数は76サンプルであり、少なくとも残り30試料以上の収集をおこない100サンプル以上

で患者解析を行う。

日本人のHPV感染におけるHPV型分類において、本年度の研究のみからでも興味ある結果を示している。まず、検出された全HPV型頻度において52型と58型（いずれも頸癌発症の高リスク群と考えられている）の割合が高く、16型・18型の割合が約45%、52型・58型が約35%程度である。扁平上皮癌に限ってみれば16型・18型の割合が約45%、52型・58型が約50%と、むしろ52型・58型の方が多い。これは、いわゆる欧米で高リスク感染頻度では80%とも考えられる16型・18型の割合に比べて、かなり日本人特有のHPV感染パターンであることが分かる。

今後、本邦における子宮がん検診でもベセスダシステムの導入が普及していくと予想されるが、本研究を継続することでその安全性と有益性が確認されるものと考えられる。さらに本研究は、日本版のHPVタイピングを併用した子宮がん検診システムの構築、子宮がん予防対策としてのワクチン開発および接種システムの構築につながり、日本国における少子化対策および国民の健康福祉に有用な情報がもたらされる。

論文発表・学会発表等では、関連解析シミュレーションにおいて、SNP 5.0 Arrayを使用することでSNPによる関連解析は充分であろうと考えられ、SNP 6.0はSNPに関する限りはSNP 5.0と比較して劇的な改善はないとの報告が多いが、評価委員からSNP 6.0使用を提示され本年度患者試料は、SNP 6.0を用いた。SNP 6.0の有利な点は、copy number variation (CNV, コピー数多型) 部位の検出におい

て優れていると思われる。しかし、本年度の対照者のジェノタイピングは SNP 5.0 の試料が含まれており、結果的には 50 万個の SNP 解析結果となっている。来年度最終年度に向けて、SNP 6.0 による対照集団の SNP タイピングを進めていく必要にせまられている。

plink 解析の対象 SNP 選択の設定は、対照集団において $MAF > 0.01$, $HWE > 0.0004$, $SNP \text{ call rate} > 0.9$ に設定した。図 2 に示すように、p-値が極端に低い SNP のなかに、クラスタリングがよくなされている rs11831414 と rs7747216 が見いだされた。しかし、これらはクラスタリングの見かけ上、きれいに分離されているだけで実際には差がなかった。クラスタリングの図は、参考としなければ優良な SNP の選別は不可能だが、確実に他の方法による確認が必須である。今後、最終年度に向けてさらなる子宮頸癌試料の収集、Genome-Wide Human SNP 6.0 Array による SNP タイピングを行っていく。

E. 結論

子宮頸癌発症と関連する高リスク型ヒトパピローマウイルス持続感染制御にかかわる SNP もしくは CNV 探索に向けて研究が立ち上がり、目標に向けて試料収集が順調に進んでいる。次年度の最終年度に向け研究は順調に進んでおり、今後試料数の増加や別法による SNP タイピングを経て、目標とした高リスク型ヒトパピローマウイルス持続感染制御にかかわる SNP もしくは CNV 探索が完了できる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sato D, Kawara H, Shimokawa O, Harada N, Tonoki H, Takahashi N, Imai Y, Kimura H, Matsumoto N, Ariga T, Niikawa N, Yoshiura K. A girl with Down syndrome and partial trisomy for 21pter-q22.13: A clue to narrow the Down syndrome critical region. *Am J Med Genet partA* 146A(1): 124-127, 2008.
2. Wu LQ, Long Z, Liang DS, Harada N, Pan Q, Yoshiura K, Xia K, Dai HP, Niikawa N, Xia JH: Pre- and postnatal overgrowth in a patient with proximal 4p deletion. *Am J Med Genet partA* 146A(6): 791-794. 2008.
3. Kuniba H, Tsuda M, Nakashima M, Miura S, Miyake N, Kondoh T, Matsumoto T, Moriuchi H, Ohashi H, Kurosawa K, Tonoki H, Nagai T, Okamoto N, Kato M, Fukushima Y, Naritomi K, Matsumoto N, Kinoshita A, Yoshiura K, Niikawa N. Lack of *C20orf133* and *FLRT3* mutations in 43 patients with Kabuki syndrome in Japan. *J Med Genet* 45(7): 479-480. 2008.
4. Kuniba H, Sato D, Yoshiura K, Ohashi H, Kurosawa K, Miyake N, Kondoh T, Matsumoto T, Nagai T, Okamoto N, Fukushima Y, Naritomi K, Matsumoto N, Niikawa N. No mutation in RAS-MAPK pathway genes in 30 patients with Kabuki syndrome. *Am J Med Genet partA* 146A(14): 1893-1896. 2008.

5. Miura K, Miura S, Yamasaki K, Yoshida A, Yoshiura K, Nakayama D, Niikawa N, Masuzaki H. Increased level of cell-free placental mRNA in a subgroup of placenta previa that needs hysterectomy. *Prenat Diagn* 28(9): 805-809, 2008.
6. Nakashima M, Tsuda M, Kishino T, Kondoh S, Kinoshita A, Shimokawa O, Niikawa N, Yoshiura K. The accuracy of SNP genotyping using genomic DNA extracted from finger nail: Comparison with blood. *Clin Chem* 54(10): 1746-1748, 2008.
7. Nakashima M, Nakano M, Hirano A, Kishino T, Kondoh S, Miwa N, Niikawa N, Yoshiura K. Genome-wide linkage analysis and mutation analysis of hereditary congenital blepharoptosis in a Japanese family. *J Hum Genet* 53(1): 34-41, 2008.
8. Oishi H, Moriyama S, Kotera K, Miura K, Masuzaki H. First case of liposarcoma arising from the fallopian tube: A case report and review of the literature. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 34 (4 pt 2): 713-716, 2008.
9. Shimada T, Miura K, Gotoh H, Nakayama D, Masuzaki H. Management of prenatal ovarian cysts. *Early Hum Dev* 84(6): 417-420, 2008.
10. Hamada T, Hirose R, Kosaka T, Taniguchi K, Noguchi M, Kihara T, Egashira M, Tagawa M, Miura K, Masuzaki H, Tajima Y, Hayashi T, Kanematsu T. Giant cystic meconium peritonitis associated with a cloacal anomaly: case report. *Journal of Pediatric Surgery* 43(3): E21-E23, 2008.
11. Yoshida S, Miura K, Yamasaki K, Miura S, Shimada T, Tanigawa T, Yoshida A, Nakayama D, Masuzaki H. Does increased nuchal translucency indicate a fetal abnormality? : A retrospective study to clarify the clinical significance of nuchal translucency in Japan. *J Hum Genet* 53(8): 688-693, 2008.
12. Yoshida A, Miura K, Nakayama D, Masuzaki H. Correlation between preeclampsia and prevalence of polymorphism of angiotensinogen, methylenetetrahydrofolate reductase and factor V, prothrombin genes among Japanese women. *Act Med Nagasaki* 53 : 37-41, 2008.
13. Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Fujishita A, Sekine I, Ishimaru T, Masuzaki H. Immunopathogenesis of pelvic endometriosis: role of hepatocyte growth factor, macrophages and ovarian steroids. *Am J Reprod Immunol* 60(5): 383-404, 2008.
14. Khan KN, Kitajima M, Imamura T, Hiraki K, Fujishita A, Sekine I, Ishimaru T, Masuzaki H. Toll-like receptor 4-mediated growth of endometriosis by human heat-shock protein 70. *Hum Reprod*.23(10): 2210-2219, 2008.
15. 三浦清徳, 新川詔夫: Wolf-Hirschhorn 症候群と猫なき症候群 別冊領域別症候群シリーズ No7. 『循環器症候群 (IV)』 第2版 (日本臨床) 332-335, 2008
16. 三浦清徳, 新川詔夫: 21 トリソミー症

- 候群, 18 トリソミー症候群, 13 トリソミー症候群, Turner 症候群 別冊領域別症候群シリーズ No7. 『循環器症候群 (IV)』第 2 版 (日本臨床) 336-341, 2008.
17. 三浦清徳, 増崎英明: 今月の臨床 不妊治療と多胎/不妊治療と双胎妊娠発生機序 臨床婦人科産科 62 巻: 3 号: 247-253, 2008.
18. 三浦生子, 三浦清徳, 吉田敦, 山崎健太郎, 増崎英明 母体血漿中に流入する胎盤由来 mRNA の同定とその臨床的意義 産婦人科の実際 57 巻: 8 号: 1315-1320, 2008.
19. 三浦清徳, 増崎英明 Assisted Reproductive Technology におけるキメラ発生の危険性 哺乳動物卵子学会誌 25 巻 206-212, 2008.
20. 三浦清徳, 増崎英明 周産期医療における胎児・胎盤由来 cell-free DNA/mRNA の臨床的意義とその応用 週刊 医学のあゆみ 第 225 巻: 9 号: 963-969, 2008.
21. 山崎健太郎, 三浦清徳, 三浦生子, 吉田敦, 平木宏一, 中山大介, 増崎英明: Discordant twins の病態に関する検討 産婦人科の実際第 57 巻: 10 号: 1575-1581, 2008.
22. 長谷川史郎, 増崎英明: 「出生前診断をめぐる諸問題一座長のまとめ」 日本周産期新生児学会誌 44: 877, 2008.
23. 吉田敦, 増崎英明: 癒着胎盤の術前診断に関する検討 産婦人科の実際 57 (12): 2021-2026, 2008
24. 吉田敦, 増崎英明: 妊娠高血圧症候群の発症および重症化の予知 産婦人科の実際 57(6): 1021-1026, 2008.
25. 牛嶋公生, 和氣徳夫, 増崎英明, 他: 婦人科癌化学療法時の悪心・嘔吐に対するインジセロトン塩酸塩の有効性および安全性. 癌と化学療法 35: 1169-1173, 2008.
26. 増崎英明 妊娠中・末期の超音波診断 産婦人科治療 96 巻: 229-234, 2008.
27. 増崎英明 妊娠初期における超音波検査 38 巻: 90-93, 2008.
28. 増崎英明 超音波検査のコツ 75 巻: 83-85, 2008.
29. 嶋田貴子, 増崎英明 妊婦における子宮頸部細胞診と子宮頸癌 ペリネイタルケア 27 巻: 2-5, 2008.
30. 藤本洋子, 増崎英明 卵巣腫瘍合併妊娠 ペリネイタルケア 27 巻: 114-117, 2008.
31. 中山大介, 増崎英明 子宮筋腫合併妊娠 ペリネイタルケア 27 巻: 226-229, 2008.
32. 宮本正史, 増崎英明 子宮頸管無力症 ペリネイタルケア 27 巻: 341-343, 2008.
33. 福田久信, 増崎英明 前期破水, 早産, 絨毛膜羊膜炎 ペリネイタルケア 27 巻: 436-439, 2008.
33. 浜崎哲史, 増崎英明 子宮動脈血流速波形を用いた妊娠高血圧症候群の発症・重症化予測 ペリネイタルケア 27 巻: 542-545, 2008.
34. 吉田敦, 増崎英明 前置胎盤・前置血管 ペリネイタルケア 27 巻: 650-653, 2008.
35. 吉村秀一郎, 増崎英明 常位胎盤早期

- 剥離・DIC ペリネイタルケア 27 巻:
748-751, 2008.
36. 宮村庸剛, 増崎英明 羊水過多・過少 ペリネイタルケア 27 巻: 848-851, 2008.
37. 東 瞳, 増崎英明 胎位異常 (骨盤位) ペリネイタルケア 27 巻: 960-963, 2008.
38. 後藤英夫, 増崎英明 帝王切開既往例における子宮破裂の予測 ペリネイタルケア 27 巻: 1064-1067, 2008.
39. 谷川輝美, 増崎英明 妊娠中の深部静脈血栓症 ペリネイタルケア 27 巻: 1162-1165, 2008.
40. 山崎健太郎, 増崎英明 IUGR(胎児発育不全) ペリネイタルケア 28 巻: 6-9, 2009.
41. 中山大介, 増崎英明 巨大児 ペリネイタルケア 28 巻: 112-115, 2009.

2. 学会発表

<国際学会>

American Psychiatric Association, 161st annual meeting, Washington DC, USA. May3-8, 2008.

Linkage analysis and mutation analysis in Paroxysmal kinesigenic choreoatetosis (PKC).
Taeko Kikuchi, Naohiro Kurotaki, Akira Imamura, Koh-ichiro Yoshiura, Norio Niikawa, Hiroki Ozawa.

The European Human Genetics Conference 2008, Barcelona, Spain, May 31 - June 3, 2008.

P05.020: Functional analysis of CD96, a causative gene for a form of C (Opitz

trigonocephaly) syndrome. T. Kaname, K. Yanagi, Y. Chinen, Y. Makita, N. Okamoto, K. Kurosawa, H. Maehara, Y. Fukushima, A. Bohring, J. M. Opitz, K. Yoshiura, N. Niikawa, K. Naritomi

P06.038: A strong association of axillary osmidrosis with genotype of the ABCC11 gene defining the earwax type. M. Tsuda, N. Miwa, M. Nakashima, M. Nakano, M. Nakashima, K. Yoshiura, T. Ohta, N. Niikawa.

The 2008 EAUHGS Symposium & the 8th EAUHGS Annual Meeting, Sapporo, Japan, July 19, 2008.

A strong association of axillary osmidrosis with genotype of the ABCC11 gene defining the earwax type. Masayoshi Tsuda, Nobutomo Miwa, Motoi Nakano, Mitsuko Nakashima, Koh-ichiro Yoshiura, Tohru Ohta, and Norio Niikawa.

A missense mutation in alternatively spliced exon 8A encoding immunoglobulin domain IIIb of *FGFR1* causes Kallmann syndrome. Kiyonori Miura, Shoko Miura, Kentaro Yamasaki, Koh-ichiro Yoshiura, Hideaki Masuzaki

Discordant nuchal translucency thickness in monozygotic twins may be an early finding of TTTS. Kentaro Yamasaki, Yuichiro Ikeda, Kiyonori Miura, Shoko Miura, Shigo Yoshida, Takako Shimada, Terumi Tanigawa, Daisuke Nakayama and Hideaki Masuzaki

The 6th Korea-Japan Ultrasound Symposium (Kawagoe Clinic, Saitama Medical University, November 1, 2008)

Discordant nuchal translucency thickness in monozygotic twins may be an early finding of TTTS. Kentaro Yamasaki, Yuichiro Ikeda, Kiyonori Miura, Shoko Miura, Shigo Yoshida, Takako Shimada, Terumi Tanigawa, Daisuke Nakayama and Hideaki Masuzaki

A case of a fetus with giant Sacrococcygeal teratoma (SCT), the timing of delivery was successfully decided by ultrasonographic findings. Atsushi Yoshida, Yuko Matsumoto, Kentaro Yamasaki, Masayuki Obatake, Masanori Egashira, Hideaki Masuzaki

<国内学会>

北海道医療大学セミナー 2008年1月8日 (北海道医療大学, 北海道)

唇裂・口蓋裂の原因遺伝子解析の現状と展望について 吉浦孝一郎

母体血漿中へ流入する ceel-free mRNA の臨床応用 三浦清徳

第12回胎児遺伝子診断研究会 2008年2月14日 (兵庫・兵庫医科大学)

X連鎖性遺伝病の出生前診断における cell-free fetal DNA を用いた性別診断の有用性 三浦清徳, 山崎健太郎, 三春範夫, 三浦生子, 嶋田貴子, 吉田敦, 中山大介, 増崎英明

第十一回胎児遺伝子診断研究会 2008年2月16日, 良順会館, 長崎.

一般演題 10: マイクロアレイを使用した全ゲノムコピー数解析による出生前診断の試み。原田直樹, 佐々木健作, 霜川修, 川良洋城, 富士山龍伊, 近藤達郎, 夫 律子, 松本直通, 吉浦孝一郎, 新川詔夫.

第8回東北出生前医学研究会 2008年2月7日 (土) 岩手県民情報交流センター アイーナ 8階.

全ゲノムコピー数解析による染色体検査 (Molecular karyotyping) の有用性. 霜川修, 佐々木健作, 近藤達郎, 松本直通, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 原田直樹.

第60回日本産科婦人科学会総会・学術講演会 2008年4月12-15日

P4-63 母体血漿中へ流入する胎盤由来 mRNA の網羅的遺伝子解析-妊娠高血圧症候群における臨床所見との関連性について- 三浦清徳, 三浦生子, 山崎健太郎, 嶋田貴子, 中山大介, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 増崎英明

P1-145 胎盤機能の推定を目指した cDNA マイクロアレイジーンチップの作成に関する検討

三浦生子, 三浦清徳, 山崎健太郎, 嶋田貴子, 中山大介, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 増崎英明

P4-245 卵巣に発生した形質細胞腫の一例 山崎健太郎, 三浦清徳, 森山信吾, 増崎英明

P1-153 性交経験がない婦人における Human papilloma virus の感染頻度に関する検討 嶋田貴子, 宮下昌子, 三浦生子, 中山大介, 三浦清徳, 増崎英明

P1-267 癒着胎盤の術前診断に関する検討
吉田敦, 谷川輝美, 三浦生子, 三浦清徳,
中山大介, 増崎英明

臨床懇話会 2008年5月10日 (長崎ワシントンホテル, 長崎市)

Severe preterm IUGRとconfined placental
mosaicism - 周産期から出生後12ヶ月に
ついて - 三浦清徳

**第65回日本産科婦人科学会九州連合地
方部会 2008年5月17-18日**

超音波断層法で胎児の蜂巣状の腸管拡張
像を認めた3例 阿部修平, 三浦清徳,
山崎健太郎, 三浦生子, 中山大介, 増崎
英明

**日本超音波医学会, 第81回学術集会, 2008
年5月23日 (金) ~ 25日 (日) 神戸国際
会議場**

出生前に胎児洞性徐脈と診断された一例
三浦清徳, 黒田 葵, 山崎健太郎, 藤本
洋子, 吉村秀一郎, 宮本正史, 増崎雅子,
三浦生子, 中山大介, 増崎英明

超音波検査で胎児筋原性疾患を疑った3
症例 東島愛, 三浦清徳, 北島道夫, 山
崎健太郎, 濱口大輔, 吉田至剛, 藤本洋
子, 山口友子, 中山大介, 増崎英明

超音波検査で胎児の下部消化管拡張を認
めた2例 阿部修平, 三浦清徳, 山崎健
太郎, 三浦生子, 宮本正史, 増崎雅子,
吉村秀一郎, 中山大介, 増崎英明

Nuchal Translucencyの形態と染色体異常
およびと頸部嚢胞性ヒグロームとの関
係に関する検討 吉田至剛, 三浦清徳,
山崎健太郎, 三浦生子, 嶋田貴子, 吉村

秀一郎, 増崎雅子, 宮本正史, 中山大介,
増崎英明

NTに差を認めた一絨毛膜性双胎の一例
山崎健太郎, 三浦清徳, 中山大介, 山口友
子, 増崎英明

前置胎盤における大量出血の予測に関す
る検討 吉田 敦, 谷川輝美, 三浦生子,
三浦清徳, 中山大介, 増崎英明

**第18回日本産婦人科・新生児血液学会学
術集会 2008年6月27-28日 (九州大学・百
年講堂, 福岡市)**

ワークショップ3 TTTS: twin-to-twin
transfusion syndrome TTTSのリスクを
推定する分子診断法の確立を目指して
-母体血漿中胎盤由来mRNAを用いた検
討- 三浦清徳, 山崎健太郎, 三浦生子,
中山大介, 増崎英明

シンポジウム5 常位胎盤早期剥離
胎児死亡例からみた常位胎盤早期剥離
の検討 谷川輝美, 三浦清徳, 吉田敦,
中山大介, 増崎英明

**第44回日本周産期・新生児医学会 2008
年7月13-15日 (パシフィコ横浜, 横浜)**

X連鎖性疾患の出生前診断における
cell-free fetal DNAの臨床応用 三浦清徳,
三浦生子, 山崎健太郎, 三春範夫, 嶋田
貴子, 吉田敦, 中山大介, 増崎英明
原因不明の羊水過多を伴った胎児筋原性
疾患の3例 東島愛, 三浦清徳, 北島道夫,
山崎健太郎, 吉田至剛, 中山大介, 増崎
英明

前置胎盤に伴う癒着胎盤の診断に関する
検討 吉田敦, 三浦生子, 三浦清徳, 中
山大介, 増崎英明

**日本遺伝子診療学会 15 回大会 2008 年 8
月 2 日 (土) ~ 3 日 (日) 仙台市戦災復
興記念館.**

マイクロアレイを使用した全ゲノムコピ
ー数解析による染色体検査の有用性と
問題点. Availability and problem of who
le genomic copy number analysis with
microarray. 霜川 修, 佐々木健作, 富士
山龍伊, 近藤達郎, 松本直通, 吉浦孝一
郎, 新川詔夫, 原田直樹.

**地域がん登録全国協議会 第17回総会研
究会 2008年9月11日 (良順会館, 長崎市)**

子宮頸部細胞診におけるベセスダシステ
ムとHPVスクリーニングの有用性 三浦
清徳, 山崎健太郎, 池本理恵, 三浦生子,
嶋田貴子, 濱口大輔, 小寺宏平, 藤下晃,
鮫島哲郎, 村上誠, 中山大介, 吉浦孝一
郎, 増崎英明

長崎県のHPV typeについて 山崎健太郎,
三浦清徳, 池本理恵, 三浦生子, 嶋田貴
子, 濱口大輔, 小寺宏平, 藤下晃, 鮫島
哲郎, 村上誠, 中山大介, 吉浦孝一郎,
増崎英明

**第 53 回日本人類遺伝学会 2008 年 9 月
27-30 日 (パシフィコ横浜, 横浜)**

W-5: 全国スーパーサイエンスハイスクー
ル (SSH) の共同による耳垢型対立遺伝子
の全国地図作成の研究. 本多隆利, 村
松紋佳, 田中清, 長嶋哲也, 小川隆, 吉
浦孝一郎, 新川詔夫

O-044: Ophthalmocracromelic 症候群のゲノ
ムワイド連鎖解析. 浜之上はるか,
Megarbane Andre, 當間隆也, 三宅紀子,
才津浩智, 堺温哉, 三浦生子, 吉浦孝一
郎, 平原史樹, 松本直通

O-046: 軟口蓋裂のゲノムワイド連鎖解析.
津田雅由, 中島光子, 平野明喜, 三古谷
忠, 山田崇弘, 吉浦孝一郎

O-047: 爪から抽出したゲノム DNA を用
いた Affymetrix 10K GeneChip による家
族性脳動脈奇形の連鎖解析. 及川将弘,
国場英雄, 近藤達郎, 永安 武, 吉浦孝
一郎

O-149: 大規模 SNP タイピングにおける爪
DNA の有用性の検討. 中島光子, 津田
雅由, 木下晃, 新川詔夫, 吉浦孝一郎

O-172: C20orf133 は歌舞伎メーキャップ症
候群の責任遺伝子ではない. 国場英雄,
津田雅由, 中島光子, 三浦生子, 近藤達
郎, 松本正, 森内浩幸, 大橋博文, 黒澤
健司, 外木秀文, 福嶋義光, 成富研二,
三宅紀子, 松本直通, 木下晃, 吉浦孝一
郎, 新川詔夫

P-013: 羊水検査で検出した稀な 9q 近位部
重複異形を有する 3 家系. 霜川 修,
佐々木健作, 坂井和裕, 長田久夫, 佐久
本薫, 近藤達郎, 松本直通, 吉浦孝一郎,
新川詔夫, 原田直樹

P-096: 古人骨における耳垢遺伝子解析の
試み (続報). 佐伯和信, 吉浦孝一郎,
新川詔夫, 岡本啓圭史, 分部哲秋

O-052: 癒着胎盤の評価に母体血漿中
cell-free placental mRNA 定量化は有用
か? 三浦清徳, 山崎健太郎, 三浦生子,
嶋田貴子, 吉田敦, 中山大介, 吉浦孝一
郎, 新川詔夫, 増崎英明